

## LAVORO ORIGINALE

# Utilità della determinazione degli anticorpi antipeptidi ciclici citrullinati nell'analisi del liquido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide

## *Usefulness of anti-cyclic citrullinate peptide antibody determination in synovial fluid analysis of patients with rheumatoid arthritis*

A. Spadaro, V. Ricciari, C. Alessandri, R. Scrivo, G. Valesini

*Cattedra di Reumatologia, Dipartimento di Clinica e Terapia Medica Applicata, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"*

### SUMMARY

**Objective:** To assess the role of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody detection in synovial fluid (SF) of RA patients compared to OA patients.

**Methods:** We evaluated in 25 RA subjects and 14 OA patients, presenting a knee-joint effusion, the main clinical and laboratory parameters including the number of painful and/or swollen joints, Ritchie index, morning stiffness, ESR, CRP and analysis of SF obtained by therapeutic arthrocentesis. IgG anti-CCP (ELISA), rheumatoid factor (RF) and total IgG (nephelometry method) were measured in SF and paired serum samples.

**Results:** We found anti-CCP antibodies and RF in 64% (16/25) and 60% (15/25) of RA sera, respectively; 72% (18/25) of RA patients were positive for anti-CCP antibodies or RF. We found a higher SF/serum ratio for anti-CCP ( $p < 0.004$ ) compared to that for total IgG. The calculation of anti-CCP concentration as IgG anti-CCP (units)/total IgG ( $\text{g L}^{-1}$ ) revealed higher values in SF than in serum ( $p < 0.046$ ) in RA patients. Among these, correlation analysis showed that anti-CCP/total IgG values in SF correlated with the relative concentration of serum anti-CCP/total IgG ( $r_s = 0.842$ ;  $p < 0.00001$ ) and serum anti-CCP antibody levels ( $r_s = 0.799$ ;  $p < 0.0001$ ). We did not find any correlation between SF anti-CCP levels and the main characteristics of SF as well as the clinical or laboratory parameters.

**Conclusion:** Our study give evidence for a preferential production of anti-CCP antibodies at RA joint level, confirming the pathogenetic role of these autoantibodies. Moreover, SF determination of anti-CCP, corrected for the total amount of the corresponding immunoglobulin, may be helpful as diagnostic tool in selected cases.

Reumatismo, 2006; 58(2):116-120

### INTRODUZIONE

Gli anticorpi anti-filaggrina, inizialmente indicati come anticorpi anti-fattore perinucleare, rappresentano un gruppo di anticorpi specifici dell'artrite reumatoide (AR) (1). La citrullinazione della filaggrina è un passaggio fondamentale per renderla immunogena (2) e i peptidi ciclici citrullinati (CCP) sono utilizzati come target antigenico per

accertare la presenza dei corrispondenti anticorpi nelle metodiche immunoenzimatiche (ELISA), caratterizzate da elevata specificità (98%) e ragionevole sensibilità (68%) (3). Gli anticorpi anti-CCP sono stati descritti nelle fasi precoci dell'AR e sembrano correlare con un danno radiologico severo (2). Alla luce di questi riscontri, recentemente è stato sviluppato un modello predittivo, basato su criteri clinici, che è in grado di discriminare tra artrite persistente non erosiva autolimitantesi e artrite persistente con andamento erosivo; tra i parametri considerati è compresa la determinazione degli anticorpi anti-CCP (4). È interessante notare come la fibrina citrullinata sia stata identificata come una delle principali proteine citrullinate della membrana sinoviale reumatoide (5, 6); inoltre, gli anticorpi anti-filaggrina (7), anti-cheratina (8-10) o

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Antonio Spadaro  
Cattedra di Reumatologia  
Dipartimento di Clinica e Terapia Medica Applicata  
Azienda Policlinico Umberto I  
Università di Roma "La Sapienza"  
viale del Policlinico 155, 00161 Roma  
E-mail: a.spadaro.reuma@virgilio.it

anti-CCP (11) sono stati descritti nel liquido sinoviale (LS).

Tuttavia, il significato clinico della determinazione degli anti-CCP nel LS non è stato ancora chiarito. Scopo della presente indagine sperimentale è stato quello di studiare gli anticorpi anti-CCP nel LS di pazienti con AR rispetto a un gruppo di soggetti affetti da osteoartrite (OA).

dianche ELISA (Quanta Lite™CCP IgG ELISA, INOVA Diagnostics, San Diego, CA). Il risultato è stato espresso in unità e la positività è stata attribuita ai sieri con valore  $\geq 20$  unità. La determinazione del FR (N latex RF, UI ml<sup>-1</sup>) e delle IgG (g L<sup>-1</sup>) è stata eseguita mediante nefelometria (Behring, Marburg, Germany). Sono stati considerati positivi i sieri con valore  $\geq 15$  UI ml<sup>-1</sup>.

## PAZIENTI E METODI

Sono stati arruolati 25 soggetti affetti da AR, diagnosticata in accordo con i criteri ACR (12) e, come popolazione di controllo, 14 pazienti con OA. Tutti i malati presentavano un versamento del ginocchio. In ciascuno di essi sono stati valutati i principali parametri clinici e di laboratorio, comprendenti il numero delle articolazioni dolenti e/o tumefatte, l'indice di Ritchie, la durata della rigidità mattutina, la velocità di eritrosedimentazione (VES), la proteina C reattiva (PCR), il fattore reumatoide (FR), gli anticorpi anti-CCP. È stata eseguita inoltre l'analisi chimico-fisica del LS ottenuto per artrocentesi terapeutica. I campioni di siero e di LS sono stati conservati a -70° C fino alla determinazione degli anticorpi anti-CCP IgG, del FR e delle immunoglobuline (Ig) G totali. Il livello degli anticorpi anti-CCP IgG è stato determinato me-

## ANALISI STATISTICA

Il confronto fra proporzioni è stato effettuato con il test del  $\chi^2$  o il test esatto di Fisher. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando, per le variabili continue, il test di Mann-Whitney per campioni indipendenti e il test di Wilcoxon per campioni appaiati. La significatività delle correlazioni è stata valutata con il coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman. I risultati sono stati espressi come mediana e 25°-75° percentile. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

Le principali caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio dei pazienti affetti da AR sono riportate nella tabella I. Abbiamo riscontrato la

**Tabella I** - Principali caratteristiche demografiche, cliniche e di laboratorio dei pazienti ammessi allo studio.

	AR (n=25)	OA (n=14)
Sesso (F/M)	18/7	10/4
Età (anni)*	53.8 (26-76)	59 (45-78)
Età all'esordio (anni)*	44 (18-72)	56 (44-66)
Durata di malattia (mesi)*	114 (6-588)	96 (12-240)
DMARDs (n/%)	22 / 88	-
Corticosteroidi (n/%)	23 / 92	-
Anti-CCP (n/%)	16 / 64	0 / 0
Fattore Reumatoide (n/%)	15 / 60	0 / 0
VES (mm/l ora)**	40 (22-50)	12 (2-36)
PCR (mg/L)**	13.5 (6-48)	3 (1-6)
Liquido sinoviale		
Viscosità ridotta (n/%)	23 / 92	4 / 28.6
Leucociti (cellule/mmc)**	8.000 (6.200 - 18.000)	500 (300 - 1.000)
Polimorfonucleati (n)**	6.000 (4.200 - 13.431)	120 (20-210)
Mononucleati (n)**	2.170 (1.880 - 3.400)	475 (200-800)
Coagulo mucinico (n/%)		
I tipo	4 / 16	12 / 85.7
II tipo	14 / 56	2 / 14.3
III tipo	7 / 28	-

\* Media (range)

\*\* Mediana (25°-75° percentile)

**Tabella II** - Livelli (mediana/25° - 75° percentile) degli anticorpi anti-CCP, IgG totali e FR nel LS e siero dei pazienti con AR (n=25) e con OA (n=14).

		LS	SIERO	RAPPORTO LS / SIERO
AR	Anti-CCP (unità)	38 / 6-228 <sup>ccc</sup>	53 / 6-210 <sup>ccc</sup>	0.97 / 0.59-1.1 <sup>b</sup>
	IgG (g L-1)	6.2 / 4.5-8.13 <sup>a</sup>	12.1 / 9.7-14.45	0.54 / 0.43-0.8
	FR (UI ml-1)	12 / 9-36 <sup>aaa c</sup>	37 / 9-111 <sup>cc</sup>	0.88 / 0.41-1
OA	Anti-CCP (unità)	7 / 6-8	7.5 / 7-10	0.81 / 0.75-0.99 <sup>b</sup>
	IgG (g L-1)	5.8 / 5.2-6.34 <sup>aa</sup>	12.58 / 11.57-14.1	0.44 / 0.36-0.6
	FR (UI ml-1)	7 / 6-7	8 / 7-8	0.87 / 0.85-0.88

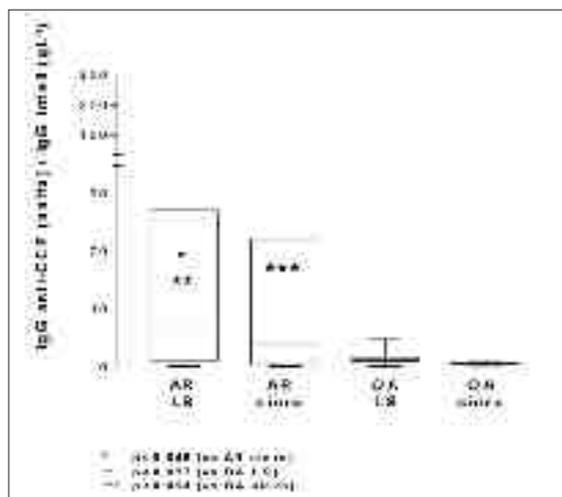
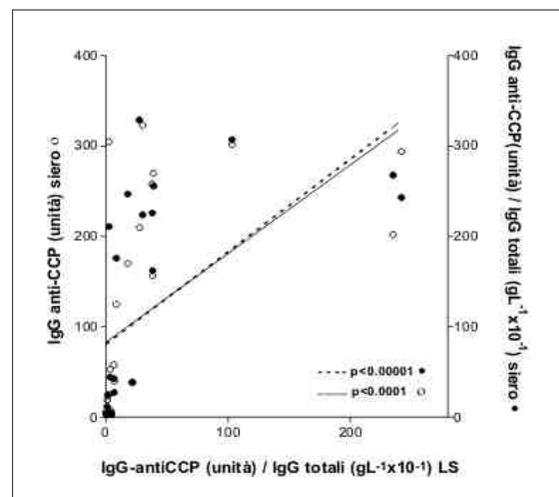
LS vs siero: <sup>a</sup>p<0.00005; <sup>aa</sup>p<0.001; <sup>aaa</sup>p<0.02; anti-CCP vs IgG: <sup>b</sup>p<0.004; AR vs OA: <sup>c</sup>p<0.01; <sup>cc</sup>p<0.02; <sup>ccc</sup>p<0.05

presenza degli anticorpi anti-CCP e del FR rispettivamente nel 64% (16/25) e nel 60% (15/25) dei sierici; il 72% (18/25) dei soggetti con AR presentava una positività isolata per anti-CCP o per FR. Nei malati con sierologia negativa per anti-CCP non abbiamo dimostrato la presenza di tali anticorpi neanche nel LS, con la sola eccezione di un paziente in cui, tra l'altro, i livelli di FR erano elevati nel siero, ma non dosabili nel LS.

Il valore degli anticorpi anti-CCP, delle IgG totali e del FR nel LS e nel siero dei pazienti con AR e OA è mostrato nella tabella II. Nei soggetti affetti da AR i livelli degli anti-CCP nel LS, sebbene leggermente inferiori, non si discostavano significativamente da quelli sierici, a differenza della riduzione osservata per i livelli del FR ( $p<0.02$ ) e delle IgG totali ( $p<0.00005$ ). Il rapporto LS/siero per gli anti-CCP IgG era significativamente più elevato rispetto allo stesso rapporto calcolato per le IgG totali ( $p<0.004$ ).

I valori (mediana/25°-75° percentile) di anti-CCP, espressi come anti-CCP IgG (unità)/IgG totali ( $\text{g L}^{-1}$ ), nel LS (6.28/1.2–29.8) dei pazienti con AR erano più elevati di quelli sierici (4.28/0.53–22.6;  $p<0.046$ ) e di quelli riscontrati nel LS (0.61/0.57–0.8;  $p<0.027$ ) dei pazienti con OA (Fig. 1). Nel LS dei pazienti con OA il valore del rapporto anti-CCP IgG/IgG totali al di sopra del 95° percentile era pari a 2.22 unità/g  $\text{L}^{-1}$ . Il 68% (17/25) dei pazienti con AR presentava un valore del medesimo rapporto superiore a questo cut-off. Solo due malati appartenenti a questo gruppo sono risultati negativi per anti-CCP nel siero. Tra i pazienti sieropositivi per anti-CCP solo uno mostrava un rapporto anti-CCP IgG/IgG totali nel LS inferiore al cut-off.

Nei soggetti con AR i valori del rapporto anti-CCP IgG/IgG totali nel LS correlavano con quelli sierici ( $r_s=0.842$ ;  $p<0.00001$ ) e con i livelli sierici degli an-

**Figura 1** - Confronto del rapporto IgG anti-CCP (unità) / IgG totali ( $\text{g L}^{-1}$ ) (grafico box & whiskers: mediana/25°-75° percentile/range) nel siero e nel LS di 25 pazienti con AR e 14 con OA.**Figura 2** - Regressione lineare tra il rapporto IgG anti-CCP/IgG totali nel LS con lo stesso rapporto nel siero (linea tratteggiata) e con i valori sierici di IgG anti-CCP (linea nera) in 25 pazienti con AR.

ticorpi anti-CCP ( $r_s=0.799$ ;  $p<0.0001$ ). Le curve di regressione lineare sono mostrate in figura 2. Nessuna correlazione è stata riscontrata tra i livelli degli anticorpi anti-CCP e i principali parametri del LS o i principali parametri di attività di malattia.

## DISCUSSIONE

Gli anticorpi anti-CCP sono altamente specifici per AR (13) e dimostrano una ragionevole sensibilità con un buon valore prognostico (13). Inoltre, la citrullina è espressa in sede intracellulare nel lining e nel sublining della membrana sinoviale dei pazienti con AR (6) e le cellule B del LS dei pazienti positivi per anti-CCP producono spontaneamente anticorpi anti-CCP (14). Ciononostante il significato clinico della determinazione degli anti-CCP nel LS non è stato ancora definito. I risultati del nostro studio dimostrano che gli anti-CCP sono presenti nel LS a livelli non significativamente differenti rispetto a quelli sierici. Abbiamo inoltre riscontrato una riduzione dei livelli di IgG nel LS rispetto al siero nei pazienti con AR, in accordo con studi precedenti (15, 16) dove sono stati riportati valori del rapporto IgG LS/siero (media = 0.67) molto simili a quelli osservati nei nostri malati (16).

I differenti livelli di immunoglobuline nel LS dei pazienti con AR e in quello dei soggetti sani sono condizionati da diverse variabili quali: la concentrazione proteica nel LS, la permeabilità microvascolare, le caratteristiche dell'interstizio sinoviale, le modalità di trasporto, le caratteristiche delle proteine (per esempio il peso molecolare o il raggio), il metabolismo sinoviale, la vascolarizzazione sinoviale e il drenaggio linfatico (17). Si ritiene infatti che IgG e IgM non siano prodotte localmente nelle articolazioni dei soggetti sani, come mostrato dall'evidenza di un basso rapporto tra concentrazione sinoviale e sierica delle IgG e IgM (0.13 e 0.04 rispettivamente) (18). Pertanto, un'adeguata interpretazione della concentrazione proteica nel LS necessita di una concomitante valutazione della concentrazione sierica e dei parametri cinetici coinvolti nella vascolarizzazione locale e nel drenaggio linfatico; fattori questi che potrebbero essere differenti per ciascuna articolazione (17). Una strategia per valutare la relazione fra la concentrazione delle proteine e la permeabilità della membrana sinoviale è quella di calcolare il rapporto LS/siero (19). Un'altra possibilità è quella di esprimere la concentrazione degli autoanticorpi (come

gli anti-CCP) corretta per la quantità totale della corrispondente classe immunoglobulinica (11). Nel nostro studio entrambi i criteri hanno dimostrato una produzione preferenziale degli anti-CCP a livello articolare nell'AR, così come descritto in precedenza (11) anche per gli anticorpi anti-cheratina (8, 9). Abbiamo infatti riscontrato un rapporto LS/siero più elevato sia per gli anticorpi anti-CCP che per le IgG. Questo dato ha trovato conferma anche dall'evidenza che la concentrazione degli anti-CCP IgG corretta per la concentrazione della corrispondente classe immunoglobulinica era più elevata nel LS rispetto al siero nei pazienti con AR. I nostri risultati sono apparentemente in contrasto con quelli ottenuti precedentemente da altri autori che non evidenziavano differenze nel titolo degli anticorpi anti-filaggrina fra il siero e il LS; va peraltro sottolineato che questo studio non considerava la correzione per la concentrazione della corrispondente IgG (7). Il rapporto anti-CCP IgG/IgG nel LS dei pazienti con AR era più alto rispetto ai malati con OA, confermando il possibile ruolo patogenetico di questi anticorpi. Infatti, mentre la presenza di proteine citrullinate nella membrana sinoviale infiammata non è specifica dell'AR, la produzione di anticorpi rivolti contro queste proteine è un evento dotato di una maggiore specificità (11, 20).

Sebbene i nostri risultati rafforzino l'idea di una produzione intra-articolare degli anticorpi anti-CCP, il significato clinico della loro presenza nel LS è incerto; nel nostro studio infatti solo due pazienti senza anticorpi anti-CCP nel siero avevano un rapporto anti-CCP IgG/IgG totali al di sopra del cut-off del 95° percentile, calcolato sul LS dei soggetti di controllo rappresentati dai pazienti con OA. Tra i pazienti con AR positivi per anti-CCP sierici, un soggetto presentava un rapporto anti-CCP/IgG al di sotto del 95° percentile. La mancanza di correlazione tra i livelli di anti-CCP nel LS e gli altri parametri clinici o di laboratorio rende questo dosaggio scarsamente utile per il monitoraggio dell'attività di malattia. In conclusione i risultati di questo studio inducono a ritenere che il dosaggio degli anti-CCP nel LS, tenendo conto della correzione per la corrispondente immunoglobulina, può essere indicato nello studio di casi selezionati di AR in cui si voglia evidenziare una sintesi preferenziale intra-articolare.

### Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la Sig.ra Giuliana Giuliani per l'eccellente assistenza tecnica.

**RIASSUNTO**

Analizzando la concentrazione degli anticorpi anti-CCP nel LS, espressa come rapporto LS/siero o corretta per le IgG totali, abbiamo dimostrato la loro produzione locale nell'AR. La mancanza di correlazione tra i livelli di anti-CCP nel LS e gli altri parametri clinici o di laboratorio rende il dosaggio di questi anticorpi nel LS di scarsa rilevanza per valutare l'attività di malattia. La buona correlazione tra il rapporto anti-CCP IgG/IgG nel LS dell'AR con quello del medesimo rapporto e del livello degli anti-CCP nel siero dell'AR, suggerisce che la determinazione di questi anticorpi nel LS dovrebbe essere riservata solo a casi selezionati.

**Parole chiave** - Anti-CCP, artrite reumatoide, liquido sinoviale.

**Key words** - *Anti-CCP, rheumatoid arthritis, synovial fluid.*

**BIBLIOGRAFIA**

1. Nienhuis RLF, Mandena EA. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The perinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23: 302-5.
2. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-81.
3. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
4. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breeveld FC, Hazes JMW. How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.
5. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific anti-filaggrin autoantibodies are deaminated forms of the alpha and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177-84.
6. Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, et al. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2255-62.
7. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, et al. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 544-52.
8. Youinou P, Le Goff P, Colaco CB, Thivolet J, Tater D, Viac J, et al. Antikeratin antibodies in serum and synovial fluid show specificity for rheumatoid arthritis in a study of connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 450-4.
9. Kirstein H, Hjarvard K, Mørk Hansen T. Antikeratin antibodies in synovial fluid in rheumatoid sarthritis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1989; 97: 185-9.
10. Quisimorio FP, Kaufman RL, Beardmore T, Mongan ES. Reactivity of serum antibodies to the keratin layer of rat esophagus in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 494-9.
11. Vossenaar ER, Smeets TJM, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3485-94.
12. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
13. Van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 2002; 4: 87-93.
14. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJE, van Koten C, Schellekens GA, de Jong BAW, van Venrooij WJ, et al. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 41-7.
15. Veys EM. Comparative investigation of protein concentration in serum and synovial fluid. *Scand J Rheumatol* 1974; 3: 1-12.
16. Willumsen L, Friis J. A comparative study of the protein pattern in serum and synovial fluid. *Scand J Rheumatol* 1975; 4: 234-40.
17. Weinberger A, Simkin PA. Plasma proteins in synovial fluids of normal human joints. *Semin Arthritis Rheum* 1989; 19: 66-76.
18. Kushner I, Somerville AJ. Permeability of human synovial membrane to plasma proteins, relationship to molecular size and inflammation. *Arthritis Rheum* 1971; 14: 560-70.
19. Killingsworth LM. Clinical applications of protein determinations in biological fluids other than blood. *Clin Chem* 1982; 28: 1093-102.
20. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Heksen MMA, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, et al. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2489-500.